

plates were probed with diluted serum samples. Serum dilutions were in 1:200 with bicarbonate buffer for toxocariasis, and 1:100 and 1:200 with blocking buffer for cysticercosis and paragonimiasis, respectively, according to the original papers for these diseases described above. Peroxidase-conjugated rec-Protein G (Zymed, San Francisco, USA) diluted in 1:1000 with blocking buffer was added into each well. Peroxidase activity was revealed by adding 0.4 mmol/l 2,2-azino-bis 3 ethybenz-thiazoline-6-sulphonic acid in 0.1 mol/l sodium citrate buffer, pH 4.7 containing 0.003% H₂O₂ at room temperature. The optical density (OD) was monitored at 405 nm on a microplate reader (ImmunoMini, model NJ-2300; Nalgene Nunc International, Tokyo, Japan). The cut-off value was calculated for each antigen based on the means+3SD of 40 healthy donors from the local areas in Cameroon (n = 20) and from Japan (n = 20).

Statistical analyses

To obtain adjusted odds ratios (ORs) of paragonimiasis and toxocariasis seropositivities for each symptom, we performed multivariate logistic regression analysis adjusted for age (-10, 11-20, 21year) and sex. Because the number of cysticercosis seropositivity was rather small (n = 3), we did not analyze the ORs of cysticercosis seropositivity. For all statistical analyses, a 5% level of significance was applied. All statistical analyses were conducted using SPSS for Windows version 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, U.S.A.).

Results and Discussion

In this study, the samples used for paragonimiasis [11] were also tested for toxocariasis and cysticercosis and also the data of STHs were analyzed. The enrolled persons (168: 78 males and 90 females) were diagnosed suffering from cough (n = 135, 80.3%), haemoptysis (n = 18, 11.3%), chest pain (n = 80, 47.6%), epilepsy (n = 14, 8.3%), visual impairment (n = 30, 17.8%) and headache (n = 106, 63.0%) and had histories of eating raw or undercooked crabs (n = 137, 81.5%) or pork (n = 135, 80.3%). Microscopic examination revealed *Paragonimus* eggs in sputum from 16 (9.5%) persons but no eggs from feces [11], whereas *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, and hookworms were found in feces from 56 [33.3%; 30 (53.5%) males and 26 (46.4%) females], 72 [42.8%; 38 (52.7%) males and 34 (47.2%) in females] and 19 [11.3%; 14 (73.6%) males and 5 (26.3%) females] persons, respectively. Among these helminthic infections, hookworm infection exclusively showed statistically significant difference between the genders (p<0.05). The difference in prevalence between males and females for hookworm infection may be due to the barefoot roaming behavior of males but further investigation of this topic is needed. The highest multiple infections were found in 3 kids infected with 3 STHs and were simultaneously seropositive for paragonimiasis and toxocariasis as well.

ELISA for diagnosis of toxocariasis, paragonimiasis and cysticercosis indicated that 61 [36.3%; 31 (50.8%) males and 30 (49.1%) females], 25 [14.9%; 10 (40%) males and 15 (60%) females] [11], and 3 [1.8%; 2 boys of 13 and 11 year-old, and one girl, 4 year-old] persons were positive (Figure 2). Persons with cough and haemoptysis were more likely to have paragonimiasis (Table 1, OR = 7.19 and 2.28 respectively, p<0.001), whereas there was a relative risk with other symptoms. As none of the symptoms were specific for toxocariasis, the probability to have the infection was equally likely in exposed and control group as OR values were close to 1 (Table 1). The likelihood for cysticercosis to occur was not included due to the low number of seropositive persons. Nonetheless, there were crucial differences in antibody

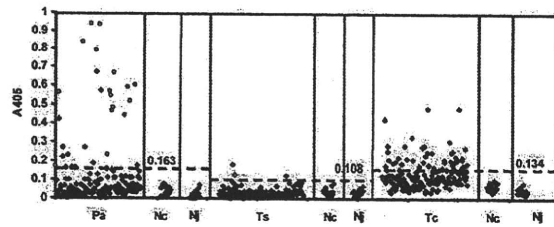


Figure 2. ELISA results for paragonimiasis (Pa), cysticercosis (Ts) and toxocariasis (Tc) from 208 persons. The surveyed persons (n = 208) include 168 and 40 (20 persons from Cameroon (Nc) and 20 from Japan (Nj)) with and without symptoms, respectively. ○, samples with *Paragonimus* eggs in the sputum. Serology could detect more cases than microscopical examination of sputum and was expected to be more sensitive for detection of paragonimiasis including immature adult stage [11]. ◇, samples positive against the recombinant antigen 100% specific to cysticercosis by immunoblot [17]. The broken line denotes the respective cut-off value for each disease and each cut-off value is shown.
doi:10.1371/journal.pntd.0000732.g002

responses between the two groups. Furthermore, there was no difference in OD values between healthy controls from endemic Cameroon and from non-endemic, Japan where we expected no positive samples from students at AMC. Therefore, we concluded that the serological findings indicated specific responses to these three helminthic infections. The ELISA system applied for paragonimiasis in this study was much more sensitive for diagnosis than detection of eggs as already shown (Figure 2) [11]. As it has already been shown that the ELISA for toxocariasis in this study showed no cross-reactions with ascariasis patients in Asia and Latin America [20,21], we consider that it is highly specific to toxocariasis. As children are the most risky population for toxocariasis and the prevalence of *T. canis* in dogs in Cameroon was very high [9], we expected that 61 persons (36.3%) were really exposed to eggs of *Toxocara* [22,23]. Among these seropositive persons, 11 persons were concluded to have dual infection of both *Toxocara* and *Paragonimus*.

Table 1. Odds ratio of positive serological test for each symptom among 188 subjects.

Type of symptom	Serological test	Odds ratio*	95%CI	P value
Headache	Paragonimiasis	1.22	0.52-2.87	0.999
	Toxocariasis	1.12	0.60-2.08	0.729
Haemoptysis	Paragonimiasis	7.19	2.68-19.30	<0.001
	Toxocariasis	0.99	0.40-2.46	0.977
Cough	Paragonimiasis	2.28	0.50-10.29	0.284
	Toxocariasis	1.97	0.75-5.16	0.167
Chest pain	Paragonimiasis	1.44	0.61-3.43	0.406
	Toxocariasis	1.33	0.71-2.48	0.371
Eye disorder	Paragonimiasis	0.91	0.23-3.64	0.910
	Toxocariasis	1.38	0.06-4.31	0.521
Epilepsy	Paragonimiasis	0.51	0.52-3.70	0.539
	Toxocariasis	1.30	0.39-4.28	0.667

*Adjusted for age (-10y, 11-20y, >21y) and sex.
doi:10.1371/journal.pntd.0000732.t001

Three children (1.7%) showing weak responses to the GPs of *T. solium* by ELISA (Figure 2) were further analyzed using the recombinant antigen for serological confirmation of cysticercosis, since there are no false positive antibody responses to the recombinant antigen by immunoblot [17–19]. Two of them showing higher OD values by ELISA (Figure 2) exhibited positive response with the recombinant antigen by immunoblot (Figure 3) [17,18]. Therefore, these two cases are considered as asymptomatic cysticercosis and are important targets for cysticercosis studies in the future. We believe that further epidemiological surveys for neurocysticercosis in the adult population should be carried out in the same areas, since 1) the late-onset epilepsy due to cysticercosis is expected to be detectable more common from senior people [3–6,24,25], 2) cysticercosis prevalence in Cameroon ranges from 2.5% to 13% [4,5] and 3) more than the half of epileptic adult patients show antibodies against cysticercosis in West and North West regions in Cameroon using the same serology [5].

In Papua, Indonesia, one of the most serious endemic areas of cysticercosis in the world, more than 80% and 70% of people over 18 years old, who had history of epileptic seizures with or without subcutaneous nodules, were confirmed as having cysticercosis, respectively [26,27]. Approximately 30% of asymptomatic healthy people were serologically identified as positive for cysticercosis and follow up investigations revealed that many of them had detectable subcutaneous nodules. Furthermore, the most recent retrospective study using molecular tools has revealed that a cysticercus of *T. solium* survived at least for 10 years in a patient's brain [28].

According to these data mentioned above, the most important implication on cysticercosis from this serological study is that asymptomatic cysticercosis can be detected from children in endemic areas. Therefore, introduction of serological screening of children becomes highly informative for detection of asymptomatic cases and for getting better and early treatment for them [29]. Follow-up studies on these 2 boys using neuroimaging tools are necessary for further evaluation. We recommend highly reliable serological screening for cysticercosis for all pupils in the primary school, if possible, or all teenagers at least in highly endemic areas. As risk factors associated with human cysticercosis include the occurrence of cysticercosis in pigs, detection of adult worm carriers should be investigated. For the future survey of taeniasis carriers,



Figure 3. Immunoblot using the recombinant antigen of the 3 samples showing weak positive response by ELISA. Sera were in 1:20 dilutions. Lane 1: negative control, lane 2: positive control, lanes 3–5: samples exhibited weak positive response by ELISA. Lanes 3 and 4 corresponding to the samples showing higher OD value by ELISA were positive to the recombinant antigen by immunoblot. doi:10.1371/journal.pntd.0000732.g003

both copro-ELISA [30] and copro-DNA tests [31] are expected to be introduced in this area, Cameroon, and in any other areas where cysticercosis is highly endemic.

Participants in the study were selected on a voluntary basis and may not be representative for the population as the whole but the numbers of children younger than 20 years were approximately 84.6% of surveyed persons. Therefore, the results are highly informative as a preliminary study identifying areas for further investigation of all these helminthic infections in this area.

In conclusion, toxocariasis, paragonimiasis and cysticercosis have been serologically confirmed among surveyed persons. Five of 14 epilepsy cases were sero-positive for toxocariasis. Correlation between epilepsy and these helminthic infections should be further evaluated, since screening of children for these parasitic diseases may become more important and feasible for the early treatment and prevention of these infections and promotion of better quality of life in the future.

Acknowledgments

We sincerely thank PM Schantz for his crucial comments and suggestions and for amendment of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RMS AI. Performed the experiments: AN YS SI. Analyzed the data: AN YS YS JK AI. Contributed reagents/materials/analysis tools: YS SI AKM CNN HY MN KN RMS AI. Wrote the paper: AN YS AI.

References

- Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA (2000) Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology* 121: SupplS23–S38.
- WHO (2002) The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization.
- Garcia HH, Pretell EJ, Gilman RH, Martínez SM, Moulton LH, et al. (2004) A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *N Engl J Med* 350: 249–258.
- Nguekam JP, Zoli AP, Zogo PO, Kamga AC, Speybroeck N, et al. (2003) A seroepidemiological study of human cysticercosis in West Cameroon. *Trop Med Int Health* 8: 144–149.
- Zoli AP, Nguekam, Shey-Njila O, Nforinwe DN, Speybroeck N, et al. (2003) Neurocysticercosis and epilepsy in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 683–686.
- Garcia HH, Modi M (2008) Helminthic parasites and seizures. *Epilepsia* 49 Suppl 6: 25–32.
- Nicoletti A, Sofia V, Mantella A, Vitale G, Contrafatto D, et al. (2008) Epilepsy and toxocariasis: a case-control study in Italy. *Epilepsia* 49: 594–599.
- Bachli H, Minet JC, Gratzl O (2004) Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. *Childs Nerv Syst* 20: 468–472.
- Komtangi MC, Mpoame M, Payne VK, Ngufor MN (2005) Prevalence of gastrointestinal helminths of dogs in Dschang, Cameroon. *J Cameroon Acad Sci* 5: 11–14.
- Moyou-Somo R, Tagni-Zukam D (2003) Paragonimiasis in Cameroon: clinicoradiologic features and treatment outcome. *Med Trop (Mars)* 63: 163–167.
- Nkouawa A, Okamoto M, Mabou AK, Edinga E, Yamasaki H, et al. (2009) Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and clinical manifestations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 255–261.
- Akao N, Ohta N (2007) Toxocariasis in Japan. *Parasitol Int* 56: 87–93.
- Esum M, Wanji S, Tendongfor N, Enyong P (2001) Co-endemicity of loiasis and onchocerciasis in the South West Province of Cameroon: implications for mass treatment with ivermectin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 673–676.
- Oye JE, Kuper H (2007) Prevalence and causes of blindness and visual impairment in Limbe urban area, South West Province, Cameroon. *Br J Ophthalmol* 91: 1435–1439.
- Yamasaki H, Araki K, Lim PK, Zasmy N, Mak JW, et al. (2000) Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J Clin Microbiol* 38: 1409–1413.
- Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, et al. (1998) Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 59: 291–294.
- Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, et al. (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol* 38: 4439–4444.
- Sato MO, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, et al. (2006) Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. *J Infect Dis* 194: 1783–1790.
- Sudewi AAR, Wandra T, Artha A, Nkouawa A, Ito A (2008) *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia: serology and mtDNA analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 96–98.
- Yamasaki H, Taib R, Watanabe Y, Mak JW, Zasmy N, et al. (1998) Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second-stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Int* 47: 171–181.

21. De Andrade Lima Coelho R, De Carvalho LB, Jr., Perez EP, Araki K, Takeuchi T, et al. (2005) Prevalence of toxocariasis in northeastern Brazil based on serology using recombinant *Toxocara canis* antigen. *Am J Trop Med Hyg* 72: 103–107.
22. Fernando SD, Wickramasinghe VP, Kapilananda GM, Devasurendra RL, Amarasooriya JD, et al. (2007) Epidemiological aspects and risk factors of toxocariasis in a pediatric population in Sri Lanka. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 983–990.
23. Sviben M, Cavlek TV, Missoni EM, Galinovic GM (2009) Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among asymptomatic children with eosinophilia in Croatia. *J Helminthol* 83: 1–3.
24. Schantz PM, Wilkins PP, Tsang VCW (1998) Immigrants, imaging, and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, eds. *Emerging Infection 2*. Washington, USA: AMS. pp 213–242.
25. Ito A, Takayanagui OM, Sako Y, Sato MO, Odashima NS, et al. (2006) Neurocysticercosis: clinical manifestation, neuroimaging, serology and molecular confirmation of histopathologic specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37: Suppl(3)74–81.
26. Wandra T, Ito A, Yamasaki H, Suroso T, Margono SS (2003) *Taenia solium*, cysticercosis, Irian Jaya, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 9: 884–885.
27. Ito A, Wandra T, Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, et al. (2004) Cysticercosis/taeniasis in Asia and the Pacific. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 4: 95–107.
28. Yanagida T, Yuzawa I, Joshi D, Sako Y, Nakao M, et al. (2010) Neurocysticercosis: assessing where the infection was acquired from. *J Travel Med* 17: 206–208.
29. Prabhakar S, Singh G (2002) Paediatric neurocysticercosis. In: Singh G, Prabhakar S, eds. *Taenia solium* Cysticercosis. Oxon, UK: CAB International. pp 257–262.
30. Guezala MC, Rodriguez S, Zamora H, Garcia HH, Gonzalez AE, et al. (2009) Development of a species-specific coproantigen ELISA for human *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg* 81: 433–437.
31. Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A (2009) Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol* 47: 168–174.

A human case of subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens* in Vietnam: histologic and molecular confirmation

Thi Cam Thach Dang · Thu Huong Nguyen ·
Trung Dung Do · Shoji Uga · Yasuyuki Morishima ·
Hiromu Sugiyama · Hiroshi Yamasaki

Received: 28 April 2010 / Accepted: 14 June 2010 / Published online: 1 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Human dirofilariasis caused by infection with *Dirofilaria* worms has been frequently reported. The symptoms associated with infection by these filarial parasites, which are transmitted to humans by zoonanthrophilic mosquitoes, are characterized by mainly pulmonary and

subcutaneous nodules. Here, we report the first case in Vietnam of a subcutaneous dirofilariasis with a painful nodule in the right eyelid. An immature female worm was removed by excisional biopsy and identified as *Dirofilaria repens* by histology and DNA analysis.

Nucleotide sequence data reported in the present paper are deposited in the DDBJ/GenBank/EMBL databases under the accession numbers AB547465 and AB547466 for the cytochrome c oxidase subunit I and 12S rRNA genes, respectively.

T. C. T. Dang (✉) · T. H. Nguyen · T. D. Do
Department of Parasitology, National Institute of Malariaology,
Parasitology and Entomology,
No. 245, Luong The Vinh street, Tu Liem,
BC 10200 Hanoi, Vietnam
e-mail: dtthach@gmail.com

T. H. Nguyen
e-mail: ngocly1404@yahoo.com.vn

T. D. Do
e-mail: giudung77@gmail.com

S. Uga
Department of Parasitology,
Kobe University Graduate School of Health Sciences,
Kobe 654-0142, Japan
e-mail: ugas@kobe-u.ac.jp

Y. Morishima · H. Sugiyama · H. Yamasaki
Department of Parasitology,
National Institute of Infectious Diseases,
Tokyo 162-8640, Japan

Y. Morishima
e-mail: morisima@nih.go.jp

H. Sugiyama
e-mail: hsugi@nih.go.jp

H. Yamasaki
e-mail: hyamasak@nih.go.jp

Introduction

The genus *Dirofilaria* (Nematoda; Filarioidea, Onchocercidae), which includes etiologic agents such as *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria tenuis*, and *Dirofilaria ursi*, is responsible for the increased occurrence of zoonotic dirofilariasis in humans around the world (Pampiglione and Rivasi 2000). Of these species, *D. repens* is a habitual parasite in the subcutaneous tissue of dogs and other carnivores that are transmitted by zoonanthrophilic mosquitoes (Culicidae). Human infections by this parasite also occur and more than 780 cases have been reported in over 37 countries in Europe, Southeast Asia, and Africa (Pampiglione et al. 1995; Pampiglione and Rivasi 2000). In Asia, human cases of *D. repens* infection have been reported in Iran, India, Sri Lanka, Malaysia, Thailand, China (Pampiglione and Rivasi 2000) and Japan (McLean et al. 1979), but such case has not yet been reported in Vietnam. In its definitive hosts, *D. repens* can easily be identified by its morphological features; however, in non-definitive hosts such as humans, these filarial worms may be more difficult to identify using morphological and histological characteristics, particularly when the clinical samples that have been removed from the subcutaneous nodules have become damaged and/or immature worms were found (Pampiglione et al. 1999). Serological examination is a useful tool for differentiating between *D. repens*

and *D. immitis* infections (Santamaría et al. 1995), while elevated levels of IgM, IgG and IgE have been used in patients exposed to other *Dirofilaria* species (Simón et al. 1997; Orihel and Eberhard 1998). In order to overcome the limitations associated with serological and histological examinations, polymerase chain reaction (PCR)-based methods capable of differentiating between *Dirofilaria* species have been developed (Favia et al. 1996, 1997a, b, 2000; Rivasi et al. 2006; Marušić et al. 2008). Here, we report the first human case of *D. repens* infection in Vietnam, diagnosed definitively by histology and PCR-based DNA analysis.

Case report

The patient was a 30-year-old Vietnamese man residing in the Ha Dong district of Hanoi, the capital of Vietnam. In 2008, the patient presented at Ha Dong Hospital complaining of a painful, itchy, swollen and tangible nodule, measuring 1.0×0.5 cm on the right eyelid. The patient was treated with an antibiotic for the first week, but the clinical symptoms did not change. No routine laboratory data, such as white blood and eosinophil counts in blood were available. On April 19, 2008, surgical biopsy was performed with the aim of diagnosis and treatment. As a result, a long, slender, whitish and living worm, approximately 4.5 cm in length and 0.5 mm in width, was removed (Fig. 1a) and clinical signs disappeared after the biopsy. The removed worm was fixed in 10% formalin and was kept at the National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology (NIMPE) in Hanoi, Vietnam before being sent to the Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases in Tokyo, Japan for identification of the parasite to the species level in 2009.

Materials and methods

A part of the formalin-fixed worm kept at the NIMPE was processed for paraffin-embedded specimen and then transverse sections were stained with hematoxylin and eosin and were observed microscopically.

To confirm the morphological identification, molecular analysis was performed as follows: the remaining worm was homogenized in a small amount of the ATL buffer supplied with a DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) before DNA was extracted overnight using the same kit. The mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) and 12S ribosomal RNA (12S rRNA) genes of the parasite were then amplified by PCR. Since the DNA samples were degraded by formalin fixation, short DNA sequences were amplified using the following primer pairs: *Diro* cox1/

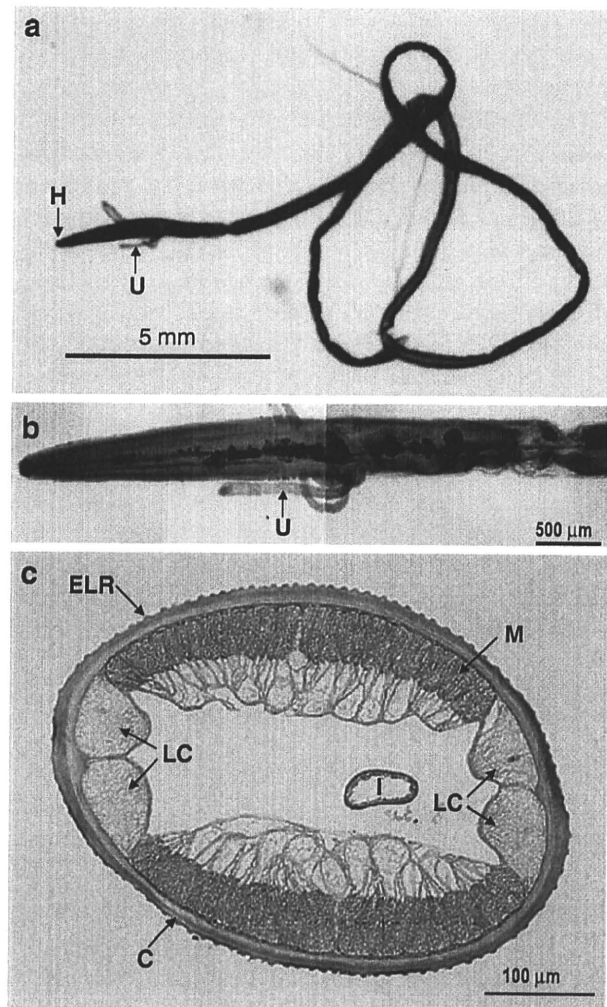


Fig. 1 Microscopic appearance and transverse section of the filarial worm surgically removed from the subcutaneous tissue of a human eyelid. **a** Removed immature female measuring approximately 4.5 cm in length and 500 μm in width. *H* head, *U* uterus. **b** Magnification of the anterior end of the worm. **c** Transverse section of the worm. Note the conspicuous external longitudinal ridges (*ELR*), polymyarian-type musculature (*M*), enlarged lateral chords (*LC*), multilayered cuticle (*C*), and intestine (*I*). Hematoxylin-eosin stain

F255 (5'-GGTGCTATTAATTTTATGGTTACT-3') and *Diro* cox1/R434 (5'-AAAAGAAGTATTAATAATTACGATC-3'), which were designed based on the cox1 gene sequences of *D. repens* (AM749234) and *D. immitis* (EU159111); and *Diro* 12S rRNA/F196 (5'-GTTTTGTTTAAACCGAA AAAATATT-3') and *Diro* 12S rRNA/R374 (5'-TAAGCCA AATATATATCTGTTTAA3'), which were designed based on the 12S rRNA gene sequences of *D. repens* (AJ544832) and *D. immitis* (EU182327). In addition, the following three primer pairs specific for 12S rRNA gene of *D. repens* were also used: *Dr*/F1 (5'-TCATTTTAATTTTAACTC TATTT-3') and *Dr*/R160 (5'-ATTAATAAACTTTGATTA

CCTGGG-3'), Dr/F121 (5'-TTGAACTGGATTAG TAACCCAGGT-3') and Dr/R284 (5'-CTAAACAATCA TACATGTGCCAATA-3'), and Dr/F260 (5'-TATTGGCA CATGTATGATTGTTAG-3') and Dr/R443 (5'-CACAT AAGAAAAAATTCTTTCTT-3'), which were designed based on accession number AJ544832. PCR amplification of the target DNAs was performed in a 50- μ L reaction mixture with Ex Taq DNA polymerase (Hot Start version, Takara Bio, Japan) and 35 cycles was performed consisting of denaturation (94°C, 30 s), annealing (58°C, 30 s) and extension (72°C, 60 s), with a final elongation step of 72°C for 5 min. The amplicons were confirmed by capillary electrophoresis (HAD-GT12, eGene Inc., CA) and were purified for use as templates for direct DNA sequencing using a NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel, Germany). Samples for sequencing were prepared using an ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Inc., CA) and sequencing was performed on an ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., CA). Sequence data were analyzed using the EditSeq and MegAlign programs of the DNASTAR package Inc. (DNASTAR, Madison, WI).

Results and discussion

The parasite exhibited movement at the time of surgical extraction. The body length measured 4.5 cm because the posterior part of the body was lacking (Fig. 1a). The uterus, which was protruding from the anterior end of the body at

the time of removal, did not contain any larval microfilariae (Fig. 1a, b). A transverse section of the parasite (Fig. 1c) revealed that the parasite had a diameter of approximately 400 μ m, a thick, laminated cuticle with external longitudinal ridges (99 ridges all around the nematode surface), and a well-developed, polymyarian-type musculature interrupted by two large lateral chords, all of which are characteristic of immature *D. (Nochtiella) repens* female worms.

In the molecular analysis, the target DNAs were successfully amplified by nested PCR using primer pairs specific for *D. repens*, but not primer pairs specific for *D. immitis* (data not shown). Figure 2 shows the alignment of the PCR-amplified *cox1* (a, 123 bp) and 12S rRNA genes (b, 362 bp) nucleotide sequences. Homology search revealed sequence similarities of 97.6% and 91.1% against the *cox1* genes of the *D. repens* (AM749233) and *D. immitis* reference sequences (EU159111), respectively. For the 12S rRNA gene, homology with the *D. repens* reference sequence (AM779772) reached as high as 99.2%; whereas, homology with the *D. immitis* reference sequence (EU182327) was lower at 85.9%. In addition, the obtained sequence data also confirmed that the filarial worm in this case was *D. repens*.

Considerable variation has been observed in the dimensions of male and female *D. repens* recovered from a variety of definitive hosts around the world. Compared with other *Dirofilaria* worms, the *D. repens* is a robust parasite with a maximum female and male body length of 17 cm and approximately 7 cm, respectively and a diameter of 650 μ m and 450 μ m, respectively, have been reported



Fig. 2 Alignment of the PCR-amplified *cox1* and 12S rRNA gene sequences. **a** *Cox1* gene; Dr V, *D. repens* obtained from a Vietnamese patient; Dr, *D. repens* (AM749233); and Di, *D. immitis* (EU159111). **b** 12S rRNA gene; Dr V, *D. repens* from this case; Dr, *D. repens* (AM779772); Di, *D. immitis* (EU182327). Arrows indicate differences between nucleotides of *D. repens* and *D. immitis*

(Orihel and Eberhard 1998). In cases of human infection, *D. repens* measuring up to approximately 660 μm in diameter have been observed (Gutierrez 1984; Pampiglione et al. 1995). In this case, the maximum body width measured approximately 500 μm . Although an extensive review of human infections by *D. repens* found that female worms were more prevalent than males (Pampiglione and Rivasi 2000), a male and a female worm have been observed in the same nodule (Mrad et al. 1999), and also in separate nodules (Fernando et al. 2000). In the majority of cases, nodules are located in subcutaneous and subconjunctival tissues, deep dermis and submucosa. According to Pampiglione and Rivasi (2000), localization is more frequent in the upper half of the body (74%), mostly in the ocular region (35.3%) and the upper limbs (11%). Although rare, localization in muscle tissue, lymph nodes (Maltezos et al. 2002) and in the deep viscera (Pampiglione and Rivasi 2000) has been reported. In this case, the nodule was located in the eyelid.

The identification of *Dirofilaria* worms can only be made with certainty after a biopsy. The morphological features of individual parasites are as follows: body length and width, thickness of the laminated cuticle, the presence and/or absence of external longitudinal ridges on the surface of the cuticle, lateral chords, and number and type of circumferential muscle cells (Orihel and Eberhard 1998; Ratnatunga and Wijesundera 1999; Pampiglione et al. 1999). However, depending on the quality of the histological sections, some of these morphological features may not be absolute. In addition, identification of the causative *Dirofilaria* agent is also closely correlated with geographic areas affected with individual *Dirofilaria* species (Orihel and Eberhard 1998).

The most precise method for identifying *Dirofilaria* worms is, therefore, molecular identification using biopsied tissues and/or parasite material. Several PCR-based diagnostic methods have been developed using DNA samples prepared from fresh and ethanol-fixed tissues (Chandrasekharan et al. 1994; Favia et al. 1996, 1997a, 2000; Cancrini et al. 1998; Vakalis et al. 1999, 2002), as well as formalin-fixed and paraffin-embedded specimens (Favia et al. 1997a; Vakalis et al. 1999, 2002; Rivasi et al. 2006; Marušić et al. 2008). These PCR-based approaches target the internal transcribed spacer two region and tandemly repeated sequence of the cuticular surface antigen gene. The combination of the PCR-based assay with DNA sequencing of the mitochondrial DNA (*cox1* and 12S rRNA genes) using formalin-fixed specimens reported here is considered to be useful for the precise identification of the *Dirofilaria* species. Such DNA analyses are useful not only for diagnostic investigations, but also for retrospective studies using histopathological specimens fixed in formalin (Yamasaki et al. 2007).

Acknowledgements This work was conducted as part of a core university program between Vietnam and Japan sponsored by the Japan Society for Promotion of Sciences. This work was also supported in part by a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan (H20-Shinko-Ippan-016).

References

- Chandrasekharan NV, Karunanayake EH, Franzen L, Abeyewickreme W, Pettersson U (1994) *Dirofilaria repens*: cloning and characterization of repeated DNA sequence for the diagnosis of dirofilariasis in dogs, *Canis familiaris*. *Exp Parasitol* 78:279–286
- Cancrini G, Favia G, Giannetto S, Merulla R, Russo R, Ubaldino V, Tringali R, Pietrobelli M, Del Nero L (1998) Nine more cases of human infection by *Dirofilaria repens* diagnosed in Italy by morphology and recombinant DNA technology. *Parassitologia* 40:461–466
- Favia G, Lanfrancotti A, Della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M (1996) Polymerase chain reaction—identification of *Dirofilaria repens* and *D. immitis*. *Parasitology* 113:567–571
- Favia G, Lanfrancotti A, Della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M (1997a) Advances in the identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* by a PCR-based approach. *Parassitologia* 39:401–402
- Favia G, Tringali R, Cancrini G (1997b) Molecular diagnosis of human dirofilariasis. *Ann Trop Med Parasitol* 91:961–962
- Favia G, Cancrini G, Ricci I, Bazzocchi C, Magi M, Pietrobelli M, Genchi C, Bandi C (2000) 5S ribosomal spacer sequences of some filarial parasites: comparative analysis and diagnostic applications. *Mol Cell Probes* 14:285–290
- Fernando SD, Ithalamulla RL, De Silva WAS (2000) Male and female filarial worms *Dirofilaria (Nochtiella) repens* recovered from the scrotum. *Ceylon Med J* 45:131–132
- Gutierrez Y (1984) Diagnostic features of zoonotic filariae in tissue sections. *Hum Pathol* 15:514–525
- Maltezos ES, Sivridis EL, Giatromanolaki AN, Simopoulos CE (2002) Human subcutaneous dirofilariasis: a report of three cases manifesting as breast or axillary nodules. *Scott Med J* 47:86–88
- Marušić Z, Stastny T, Kirac I, Stojčević D, Krušlin B, Tomas D (2008) Subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens* diagnosed by histopathologic and polymerase chain reaction analysis. *Acta Dermatovenerol Croat* 16:222–225
- McLean JD, Beaver PC, Michalek H (1979) Subcutaneous dirofilariasis in Okinawa, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 28:45–48
- Mrad K, Romani-Ramah S, Driss M, Bougrine F, Hechiche M, Maalej M, Romdhane KB (1999) Mammary dirofilariasis. A case report. *Int J Surg Pathol* 7:175–178
- Orihel TC, Eberhard ML (1998) Zoonotic filariasis. *Clin Microbiol Rev* 11:366–381
- Pampiglione S, Rivasi F (2000) Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia* 42:231–254
- Pampiglione S, Canestri Trotti G, Rivasi F (1995) Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: a review of world literature. *Parassitologia* 37:149–193
- Pampiglione S, Rivasi F, Canestri-Trotti G (1999) Pitfalls and difficulties in histological diagnosis of human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:57–64
- Ratnatunga NVI, de Wijesundera MS (1999) Histopathological diagnosis of subcutaneous *Dirofilaria repens* infection in humans. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30:375–378

- Rivasi F, Boldorini R, Criante P, Leutner M, Pampiglione S (2006) Detection of *Dirofilaria (Nochtiella) repens* DNA by polymerase chain reaction in embedded paraffin tissues from two human pulmonary locations. *APMIS* 114:567–574
- Santamaría B, Di Sacco B, Muro A, Genchi C, Simón F, Cordero M (1995) Serological diagnosis of subcutaneous dirofilariasis. *Clin Exp Dermatol* 20:19–21
- Simón F, Prieto G, Muro A, Cancrini G, Cordero M, Genchi C (1997) Human humoral response to *Dirofilaria* species. *Parassitologia* 39:397–400
- Vakalis N, Spanakos G, Patsoula E, Vamvakopoulos NC (1999) Improved detection of *Dirofilaria repens* DNA by direct polymerase chain reaction. *Parasitol Int* 48:145–150
- Vakalis N, Vougioukas N, Patsoula E, Spanakos G, Sioutopoulou DO, Vamvakopoulos NC (2002) Genotypic assignment of infection by *Dirofilaria repens*. *Parasitol Int* 51:163–169
- Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Sako Y, Ito A (2007) Significance of molecular diagnosis using histopathological specimens in cestode zoonoses. *Trop Med Health* 35:307–321

虫体の遺伝子解析により診断された日本海裂頭条虫症の兄妹例

春日井市民病院小児科¹⁾, 国立感染症研究所寄生動物部²⁾

小出 照子¹⁾ 山崎 浩²⁾ 渡辺 伸元¹⁾
木許 泉¹⁾ 河邊太加志¹⁾

要 旨

富山産サクラマスの生食が原因と考えられる日本海裂頭条虫に感染した小児の兄妹例を経験した。2例とも肛門から便とともに紐状の虫体を排出したのに気づき受診した。糞便内の虫卵と自然排出された虫体の形態より当初は広節裂頭条虫と同定され、プラジカンテルで駆虫された。駆虫にて、兄からは頭節を欠く1虫体が、妹からは頭節を有する2虫体がそれぞれ排出された。ホルマリン固定された虫体について、より詳細な形態観察と遺伝子解析を行ったところ、排出された虫体はすべて日本海裂頭条虫と同定された。本症は成人のみならず、低年齢層の症例も報告されており、小児科医が経験するのも稀ではない。日本海裂頭条虫と広節裂頭条虫の形態学的鑑別は困難なことも多く、その確定診断には遺伝子解析が望まれる。

キーワード：日本海裂頭条虫症，小児，サクラマス，遺伝子検査，プラジカンテル

はじめに

裂頭条虫症は、真田紐に似ていることから真田虫と呼ばれる裂頭条虫属条虫による寄生虫症である。古くは石器時代から見られる。その主要な原因種として、1758年、Linneにより広節裂頭条虫 (*Diphyllobothrium latum*) が記載された。わが国における科学的研究は、1886年、飯島が利根川産のマスから得た幼虫を自ら飲んで成虫を得、この条虫が北欧バルト海沿岸産の広節裂頭条虫と同一であると報告したことに始まる¹⁾。しかし、1986年、山根らによる日本産裂頭条虫の分類学的再検討の結果、日本産の裂頭条虫は広節裂頭条虫とは形態学的にも生態学的にも異なる別種、日本海裂頭条虫 (*Diphyllobothrium nihonkaiense*) であることが明らかにされた²⁾。最近ではDNAレベルにおいても別種であることが証明されている³⁾。また、広節裂頭条虫症で見られるビタミンB₁₂欠乏性貧血が日本海裂頭条虫症では見られないなど、臨床的にも異なっている。

日本海裂頭条虫症は、日本人のサケ・マスの生食習慣を反映して比較的発生頻度の高い寄生虫症である。最近では生鮮魚の輸送システムの進歩と相まって増加傾向にある⁴⁾。従来、本症の診断は原因となった虫体の形態に基づいて行われていた。しかし、日本海裂頭条虫と広節裂頭条虫の形態が酷似するために、最近では遺伝子解析による虫体鑑別が行われている^{5,6)}。

今回、われわれはサクラマスの生食が原因と考えら

れる日本海裂頭条虫症の小児兄妹例を経験した。ホルマリン固定標本を用いた遺伝子解析により確定診断された例として、その感染予防と治療に関する文献的考察を加えて報告する。

症 例

【症例1】3歳，男児

【主訴】虫体の排出

【家族歴】父が肛門より虫体(片節)を排出していた。その後、祖母と母からも虫体の排出が認められた。

【現病歴】平成17年8月27日朝および28日朝、紐状のものが便とともに排出されたので外来を受診した。同年9月5日、再度排出した虫体を持参して外来を受診した。糞便検査によって検出された虫卵と自然排出された虫体の肉眼的観察から、広節裂頭条虫と同定された。排出された虫体は体長約90cmで頭節を欠いていた。

平成15年4月(1歳)から平成17年6月10日(3歳)にかけて、祖父が富山県の河川で釣ったサクラマスの刺身を数回にわたって食べていた。

【来院時現症】体重16kg, 貧血を認めず、その他身体所見異常なし。

【経過】外来で駆虫を施行した。前日は低残渣食とし、夜、クエン酸マグネシウムを服用した。朝は絶食とし、水様便を確認後、プラジカンテル30mg/kgを経口投与した。2時間後、クエン酸マグネシウムを服用したところ、体長165cmの虫体が排出され(図1A-a)、頭節は確認されなかった。再度クエン酸マグネシウムを投与したが、それ以上の虫体排出はなかった。

(平成21年5月22日受付)(平成22年1月13日受理)

別刷請求先：(〒486-8510) 春日井市鷹来町1丁目1番地1

春日井市民病院小児科

小出 照子

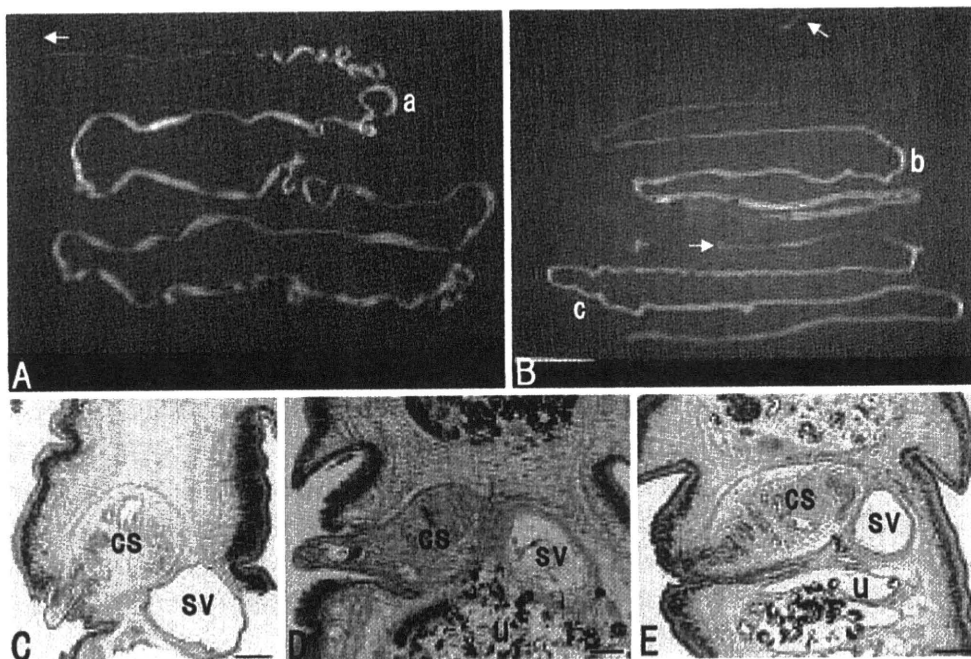


図1 駆虫された日本海裂頭条虫成虫とその片節の正中矢状断面の形態. A, 症例1から得られた虫体 (a). B, 症例2から得られた虫体 (b, c). 矢印は頭節. C~E, 3虫体 (a~c) 片節の正中矢状断面をヘマトキシリン・エオジン染色したもの. C, 虫体 a. 陰茎囊は片節の前後軸に対して斜位を取り, 貯精囊はその後方に位置する. D, 虫体 b. 陰茎囊は水平に近い位置を取る. E, 虫体 c. 陰茎囊は斜位を取るが, D, E いずれも貯精囊は陰茎囊の後方に位置している. cs, 陰茎囊 (cirrus sac); sv, 貯精囊 (seminal vesicle); u, 虫卵を含む子宮 (uterus). スケールバー = 100 μ m.

3週間後と10か月後の糞便検査では虫卵陰性, その後虫体の排出を認めていない.

〔症例2〕3歳, 女児

〔主訴〕虫体の排出

〔家族歴〕症例1の妹

〔既往歴〕平成17年9月の糞便検査では虫卵陰性,

その他, 特記すべきことなし.

〔現病歴〕平成18年6月初旬から便内に虫体排出を認めた. 6月19日, 再度排出した虫体を持参して外来を受診した. 糞便検査によって検出された虫卵と自然排出された虫体の肉眼的観察から, 広節裂頭条虫と同定された. 虫体は2虫体あり, それぞれ体長約120cmで頭節を欠いていた.

平成16年3月(1歳)から平成17年6月10日(2歳)にかけて, サクラマスの刺身を食べていたが, 症例1から裂頭条虫が排出された後は食べていなかった.

〔来院時現症〕体重14.2kg, 貧血を認めず, その他身体所見異常なし.

〔経過〕外来で駆虫を施行した. 症例1と同様, 低残渣食, プラジカンテル, クエン酸マグネシウムで駆虫したところ, 体長約80cm, 頭節を有する2虫体が排出された(図1B-b, c). 駆虫された虫体はしばらくの間, 運動性が確認された. 3週間後の糞便検査では虫卵陰性, その後虫体の排出を認めていない.

虫体の同定

排出された3虫体片節は10%ホルマリンで固定後, パラフィン包埋標本を作製し, その正中矢状断面の形態を観察した. 症例1から得られた虫体(図1C)では, 片節の前後軸に対して陰茎囊(cs)が斜位を取り, 貯精囊(sv)は陰茎囊の後方に位置していたことから, 日本海裂頭条虫の特徴と考えられた⁷⁾. 症例2から得られた2虫体では, 陰茎囊の位置が水平位を取る虫体(図1D)と斜位を取る虫体(図1E)が観察されたが, 貯精囊はいずれの虫体とも陰茎囊の後方に位置していたことから, これらも日本海裂頭条虫と考えられた.

この形態に基づいた種鑑別結果を確認するために, 遺伝子解析を既法に準じて行った⁵⁾. 各片節とも厚さ10 μ mに薄切した無染色パラフィン切片2枚から市販のキット(DEXPAT, タカラバイオ)を用いてDNAを抽出し, polymerase chain reaction (PCR)によるミトコンドリアDNAのcytochrome c oxidase subunit 1遺伝子(*cox1*)の増幅を試みた. その結果, 3虫体とも120, 139, 267, 396bpの短い*cox1*遺伝子断片が増幅され(データは図示していない), 最長396bpの遺伝子断片の塩基配列を解析したところ, 虫体(図1A-a, C)と虫体(図1B-b, D)は同一配列であり(DDBJ/EMBL/GenBank, AB353730), 虫体(図1B-c, E)とは756

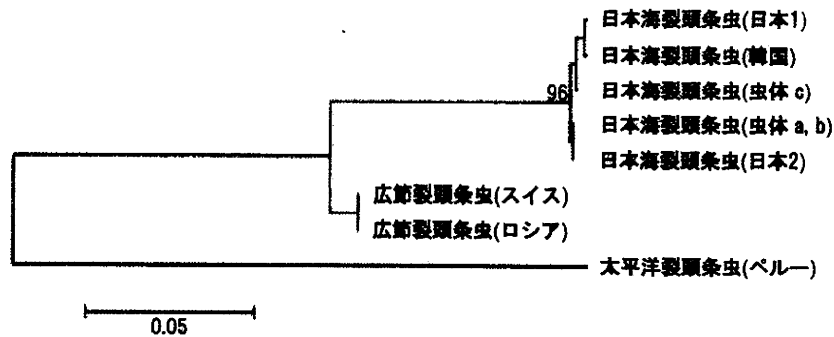


図2 Cox1 遺伝子断片 (396bp) の塩基配列に基づいて作成した系統樹。比較に用いたヒトに寄生する裂頭条虫 *cox1* 遺伝子データは以下のアクセッション番号のものである。
 日本海裂頭条虫：日本1 (AB015755), 日本2 (AB268585), 韓国 (DQ768190)；
 広節裂頭条虫：スイス (AB412560), ロシア (AB269325)；太平洋裂頭条虫：ペルー (AM747494)。
 分岐上の数字は1,000 反復のブートストラップ値。スケールバーは木村の2パラメーター法によって求めた遺伝距離値を示す。

番号の塩基に違いが見られたが (DDBJ/EMBL/GenBank, AB353731), 3 虫体とも日本海裂頭条虫と同定された (図2)。

考 察

わが国では、かつて回虫、鉤虫、鞭虫など土壌伝播性寄生虫症が蔓延していたが、国家的対策や生活環境の向上などによって現在では激減した。一方、日本人の食習慣を反映して増加している寄生虫症もある。日本海裂頭条虫症はその代表的な寄生虫症の一つであり、1970年代より増加傾向にある⁴⁾。サケ・マスの刺身、寿司、燻製などがその原因と考えられている。日本海裂頭条虫症はこれまでは日本を中心に症例が報告されていたが、最近ではサケ・マスなどの生鮮魚の冷蔵輸送システムの進歩によって、国内はもとより海外駐在の邦人における症例も報告されている⁶⁾。

日本海裂頭条虫の成虫は体長5~10m, 最大幅10~15mm, 体節数は3,000~4,000にも及ぶが、頭節は縦2mm, 横1mmと細く、両側に一對の吸溝を有する棍棒状を呈し、それが裂頭条虫の由来となっている。その生活史は完全には解明されていないが、ヒトは第2中間宿主である降海性のサクラマス、カラフトマス、シロザケ (トキシラズ) に寄生する幼虫 (=プレロセルコイド) を経口摂取することによって感染する。摂取されたプレロセルコイドはヒトの小腸上部に吸着し成虫となる。通常は1条寄生であるが複数寄生もある。

日本海裂頭条虫症の診断は糞便内虫卵の形態や、排出あるいは駆虫された虫体片節の形態に基づいて行われる。中でも陰莖囊と貯精囊の位置関係が日本海裂頭条虫と広節裂頭条虫の鑑別に重要である⁷⁾。しかし、固定時の虫体の収縮などにより形態学的鑑別は困難なこ

とも多く、裂頭条虫の鑑別には遺伝子解析が欠かせない⁸⁾⁹⁾。本症例でも、虫卵と片節の形態から当初は広節裂頭条虫と同定されたが、最終的には遺伝子解析によって日本海裂頭条虫であることが判明した。

今回報告した2症例は数回にわたって摂食したサクラマスの刺身が感染源と考えられた。釣ったサクラマスは業務用の冷凍庫 (-20℃) で約3時間冷凍し、氷詰めにして持ち帰ったという。広節裂頭条虫のプレロセルコイドに対する死滅条件は、加熱で56℃/5分間、低温では-18℃の冷凍で魚体内温度-10℃であり、3~4kgの魚体であれば安全処理に-18℃で20時間以上要することが報告されている⁹⁾。日本海裂頭条虫のプレロセルコイドについてもこれに準ずると考えられる。今回報告の感染源と思われるサクラマスは3.8kgと大きく、-20℃で3時間の冷凍処理では不十分だったと考えられる。いずれにしても、サクラマスを生食する場合には十分な冷凍処理を行うことが肝要である。

日本海裂頭条虫症の治療は、プラジカンテルの服用が一般的である。本剤は当初住血吸虫駆虫薬として開発されたが、消化管寄生条虫症への有効性が明らかになり使用されている。副作用として、腹部不快感や腹痛などの消化器症状が認められることがあるが、一般には軽微であり安全性は高く⁹⁾、成人のみならず小児の裂頭条虫症に対しても用いられている¹⁰⁾¹¹⁾。本症例では、虫体排出を主訴に受診し、また受診時の糞便検査で虫卵が検出されたために、プラジカンテルによる駆虫を行った。駆虫後の糞便検査では虫卵陰性、またその後虫体排出もなかったことから、完全に駆虫されたと判断した。症例2の感染時期は、不明な点もあるが症例1の虫体排出以前であった可能性が高く、17年9月には感染していたが糞便検査で虫卵陰性であったこ

とになる。それは、広節裂頭条虫で報告されている周期的体節離脱現象に伴う70~140日にも及ぶ虫卵無排出期であったと考えられる¹²⁾。虫体排出時に虫卵陰性であったが、約3か月後に虫卵陽性となった日本海裂頭条虫症の報告もある¹³⁾。感染の可能性があり虫卵陰性の場合には、少なくとも5か月の経過観察が必要とされる。他の駆虫方法として、十二指腸ゾンデを用いてガストログラフィンを局所注入する方法が成人で適応されることがある。しかし、小児では種々の困難を伴うことから、本症例には適応しなかった。

日本海裂頭条虫症は小児においてもけっして珍しい疾患ではなく、虫体の排出に遭遇した際には、サナダムシ=広節裂頭条虫と診断するのではなく、寄生虫関連の研究機関や大学等に正確な条虫種の同定依頼を行うことも大切であると考えられた。

本論文の要旨は第110回日本小児科学会学術集会(2007年、京都)において発表した。

謝辞 パラフィン切片作成の労を取っていただいた旭川医科大学動物実験施設の中谷和宏准教授に深謝いたします。本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「顧みられない病気に関する研究」(H20-新興一般-016)によって行われた。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Ijima I. The Source of *Bothriocephalus latus* in Japan. The Journal of the College of Science, Imperial University, Japan 1888; 2: 49-56.
- 2) Yamane Y, Kamo H, Bylund G, et al. *Diphyllobothrium nihonkaiense* sp. nov. (Cestoda: Diphylobothriidae)—revised identification of Japanese

- broad tapeworm—Shimane J Med Sci 1986; 10: 29-48.
- 3) Nakao M, Abmed D, Yamasaki H, et al. Mitochondrial genomes of the human broad tapeworms *Diphyllobothrium latum* and *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Cestode: Diphylobothriidae). Parasitol Res 2007; 101: 233-236.
- 4) 山根洋右. サナダムシ物語. 多田 功編. 別冊・医学のあゆみ 現代寄生虫病事情. 東京: 医歯薬出版, 2006: 63-68.
- 5) Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, et al. Significance of molecular diagnosis using histopathological specimens in cestode zoonoses. Trop Med Health 2007; 35: 307-321.
- 6) Shimizu H, Kawakatsu H, Shimizu T, et al. Diphylobothriasis nihonkaiense: possibly acquired in Switzerland from imported Pacific salmon. Inter Med 2008; 47: 1359-1362.
- 7) 加茂 甫. 裂頭条虫の同定のためのハンドブック. 東京: 現代企画, 1999: 1-143.
- 8) Salminen K. The effect of high and low temperature treatments on the infectiveness of *Diphyllobothrium latum* with regard to public health. Acta Vet Scand (Suppl) 1970; 32: 1-29.
- 9) 金澤 保. 病原寄生虫の治療と薬剤 条虫症~エキノコックス症を含めて~. 医薬ジャーナル 2001; 37: 2993-2997.
- 10) 川谷正男, 土田晋也, 福本由紀子, 他. 幼児条虫症の3例. 小児内科 1996; 28: 455-457.
- 11) 熊谷 健, 奥田真珠美, 宮代英吉, 他. マスの生食が原因と推定される日本海裂頭条虫症の9歳女児例. 小児科臨床 1998; 51: 1839-1843.
- 12) 加茂 甫, 矢崎誠一, 福本宗嗣. 広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum* (Linne, 1758) ヒト実験寄生にみとめられた卵排出周期性. 寄生虫学雑誌 1986; 35: 53-57.
- 13) 中村 造, 中村(内山)ふくみ, 古宮伸洋, 他. 反復する検便の重要性を示す日本海裂頭条虫症の1例. Clin Parasitol 2007; 18: 64-66.

Two Infant Cases of Diphylobothriasis Nihonkaiense Diagnosed Definitively by DNA Analysis of Causative Tapeworms

Teruko Koide¹⁾, Hiroshi Yamasaki²⁾, Nobuyuki Watanabe¹⁾,
Izumi Kimoto¹⁾ and Takashi Kawabe¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Kasugai City Hospital

²⁾Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

Two infant cases with diphylobothriasis nihonkaiense were reported. A boy and his sister naturally expelled proglottids after ingesting raw masu salmon (*Oncorhynchus masou*), which were caught in the rivers of Toyama Prefecture. The two patients were successfully treated with praziquantel at doses of 30mg/kg. After deworming, the causative tapeworms were identified as *Diphyllobothrium nihonkaiense* by morphology of reproductive organs and mitochondrial DNA analysis. Recently, human diphylobothriasis including children is increasingly reported. Identification of the *Diphyllobothrium* tapeworms is difficult due to their morphological similarities. Thus, if possible, accurate identification of the *Diphyllobothrium* species based on DNA analysis would be highly recommended.

寄生虫の臨床検査—外来でできる検査手法と依頼検査の依頼法の実際—
免疫血清検査と遺伝子検査で確認できる寄生虫と依頼方法

山崎 浩

国立感染症研究所寄生動物部/やまさき・ひろし

はじめに●

寄生虫の検査法には、糞便検査によって寄生虫の虫卵や原虫の嚢子などを検出する方法や駆虫や手術によって虫体が得られた場合にはそれを調べて直接的に寄生虫の存在を確認する方法がある。一方、幼虫移行症のようにヒト体内で成虫に発育できない寄生虫の場合には、虫卵が排出されないで、寄生虫に対する特異抗体や寄生虫抗原を検出することによって、間接的に寄生虫感染を証明する方法がある。間接的な方法は悪性腫瘍など外科手術が適用になる疾患との鑑別などにも用いられる。本稿では、紙面の都合上、寄生蠕虫症に絞った抗体検出による免疫血清学的方法(以下、血清検査)と寄生虫のDNA検出とその解析に基づいた遺伝子検査法について事例を紹介する。

免疫血清学的検査●

抗体検出による血清検査が有効とされる寄生虫症は表1に示した。ここで述べる血清検査は寄生虫抗原に対して産生される特異抗体を、ペルオキシダーゼあるいはアルカリホスファターゼなど酵素を標識した二次抗体と順次反応させ、最後に酵素に対する基質を加えて発色させ、可視化するという原理に基づいている。しかし、検査に必要な抗原調製法や検査法、あるいは判定基準は検査実施機関ごとに異なり、標準化されていないのが現状である。血清検査の実践的技、感度や特異性などに関してはすでにいくつかの総説があるので¹⁾、それらを参照願いたい。

1. 酵素抗体法(ELISA)

本法は簡便で検出感度が高く、寄生虫症の検査に汎用されている。ポリスチレン製96穴マイクロプレートの穴(well)に抗原を結合させ、被検者血清(胸水、硝子体液など)、標識二次抗体と順次反応させ、最後に基質を加え、吸光度を測定して

表1 抗体検出による免疫血清学的検査が有効とされる寄生虫

原虫症
赤痢アメーバ症
トキソプラズマ
マラリア
蠕虫症
イヌ回虫症・ネコ回虫症(トキソカラ症)
アニサキス症
広東住血線虫症
顎口虫症
旋尾線虫症
イヌ糸状虫症
旋毛虫症
ウェステルマン肺吸虫症
宮崎肺吸虫症
肝蛭症
住血吸虫症
マンソン孤虫症
有鉤囊虫症
多包虫症・単包虫症(エキノコックス症)

判定する方法である。一度に多検体の検査が可能であるので、スクリーニング検査に向いている。図1は胸水貯留が認められた患者について、肺に寄生する可能性のある4種類の寄生虫を想定して行ったスクリーニング検査例である。この患者の場合、ウェステルマン肺吸虫抗原に対する特異抗体が検出された。筆者らの研究室では、標識二次抗体として抗ヒトIgG抗体に替わり、ペルオキシダーゼ標識 Protein G を用いている。

2. ウェスタンブロット(イムノブロット)

寄生虫抗原成分(蛋白質)をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した後、抗原を物理的、化学的耐久性に富むポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜やニトロセルロース膜に電氣的に転写する。さらに、膜上の抗原と被検者血清、標識二次抗体、発色基質を順次加えると、膜上に着色

- 抗体検出を目的とした血清検査でも感染初期や単数寄生例では抗体は検出されにくい。
- 抗体陽性の場合、寄生虫症の既往をみている可能性も考えられる。

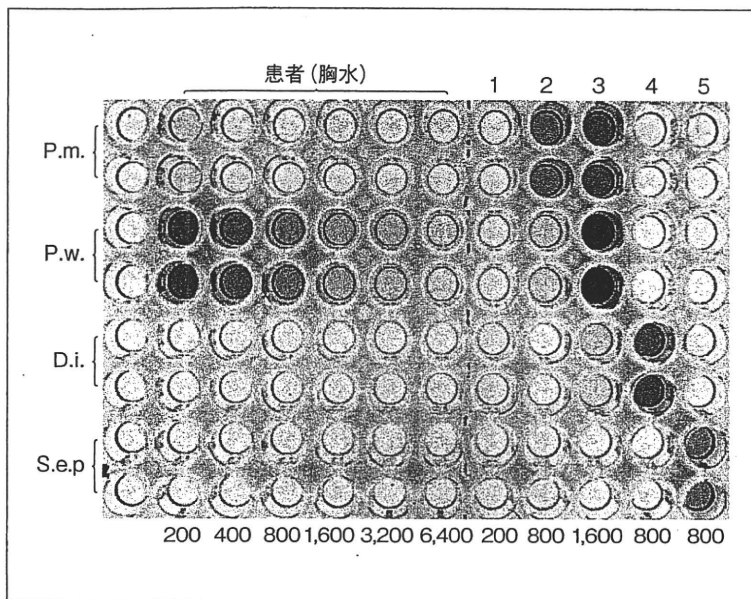


図1 酵素抗体法による寄生虫症のスクリーニング検査

患者胸水を用いて4種類の寄生虫抗原に対する特異的IgG抗体の検出を行ったところ、ウエステルマン肺吸虫抗原(P.w.)に対する抗体が検出された。

P.m.: 宮崎肺吸虫抗原, P.w.: ウエステルマン肺吸虫抗原, D.i.: イヌ糸状虫抗原, S.e.p.: マンソン孤虫抗原。

1. 陰性対照血清, 2. 宮崎肺吸虫症患者血清, 3. ウエステルマン肺吸虫症患者血清, 4. イヌ糸状虫症患者血清, 5. マンソン孤虫症患者血清。

plate下の数字は胸水ならびに血清の希釈倍率。

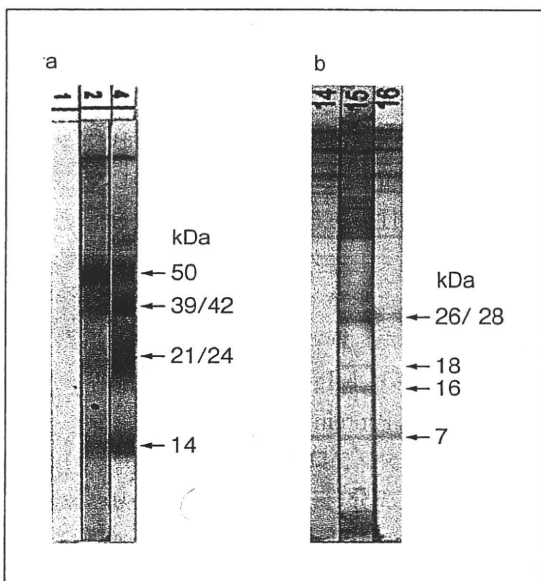


図2 ウェスタンブロットによる検査

a 有鉤囊虫症, b エキノコックス症

1, 14: 陰性対照血清, 2, 15: 陽性対照血清, 4, 16: 被検患者血清。

したバンドとして可視化される。図2は市販の有鉤囊虫症検査キット(Immunitics社)とエキノコックス症検査キット(LDBIO DIAGNOSTICS社)を用いた検査例を示した。それぞれの寄生虫に特異的な分子サイズの抗原に対するバンドが検出されるか否かで判定する。確定検査に適した方法である。

3. イムノクロマト

抗原を吸着させたニトロセルロース膜を固相(担体)としてデバイスに内蔵し、小穴に被検者血清、展開液、標識二次抗体、発色基質を順次滴下すると、抗体が抗原部位まで移動してその部位が発色する。移動相が垂直式と水平式のものがあり、図3には垂直式のトキソカラ症検査キットを示した²⁾。陽性であれば小穴の中心部に赤色スポットが出現する。国立感染症研究所寄生動物部(以下、感染研)でも、遺伝子組換え抗原を吸着させた水平式のトキソカラ症検査キットを開発中で

- 抗原検出法は現在の感染を証明する方法である。
- 抗体検査によるフォローアップは予後や治癒判定に使える。
- 抗体検査用の抗原は、特異性や品質の向上、あるいは安定的供給のために、遺伝子組換え抗原も開発されている。

ある。本法の最大の利点は手技の簡便さと検査時間の迅速性(数分から10数分)にある。イムノクロマトキットは世界的に見ると、マalaria診断用キットが最も多く開発、市販されており、国内でもNow[®] Malaria (Binax社)やOptiMAL-IT (DiaMed社)が入手しやすい。トキソカラ症キットも含めたこれらのイムノクロマトキットは体外診断薬としては国内未承認であるが、総合的に診断するうえでの判断材料としては利用することができる。

4. 遺伝子検査

寄生虫の遺伝子検査は、原因となった寄生虫種を同定して確定診断する目的、あるいは病原性や薬剤耐性との関連性を調べるなどの目的で重要な検査法である。基本的にはすべての寄生虫に適用できる。遺伝子検査の対象となる検体は、糞便内の寄生虫卵や原虫の嚢子やオーシスト、自然排出、あるいは駆虫された虫体、内視鏡的、あるいは外科的に摘出された虫体や病巣、ホルマリン固定病理組織標本や血液塗抹標本などさまざまである。遺伝子検査法の基本原理は標的遺伝子をpolymerase chain reaction (PCR)によって増幅し、増幅産物の塩基配列を直接解析する方法、増幅産物の制限酵素切断パターン解析(Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)、鑑別すべき寄生虫種に特異的な複数のプライマーを混ぜて1本のチューブ内でPCRを行うmultiplex PCR³⁾、あるいは鎖置換反応を利用して一定温度(60~65℃)でPCRを行うloop-mediated isothermal amplification (LAMP)⁴⁾などがある。標的遺伝子はミトコンドリアゲノムでコードされるcytochrome c oxidase subunit 1遺伝子(以下、*cox1*)や核DNAのリボソームRNA遺伝子のinternal transcribed spacer (ITS-1, ITS-2)領域が用いられることが多い。図4は互いに形態が酷似し、駆虫薬による治療にあたっては事前に鑑別

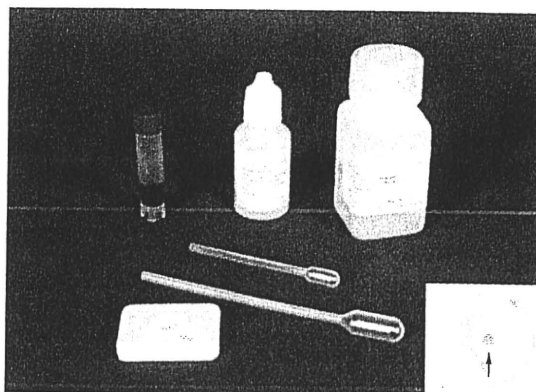


図3 イムノクロマト法によるトキソカラ症検査キットに含まれるデバイスと試薬。陽性であれば、小孔中央部に赤色スポット(矢印)が出現する。(東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫学分野 赤尾信明准教授提供)

が必要とされる無鉤条虫と有鉤条虫の multiplex PCRによる鑑別例を示した。この multiplex PCRでは、無鉤条虫の場合は827 bp、有鉤条虫の場合は984 bpの*cox1*遺伝子が増幅されるようにプライマーが設計されているので、増幅産物の大きさで両者を正確に鑑別することができる³⁾。また、全長1,620 bpの*cox1*遺伝子の723番目の塩基は種間で高度に保存されているので、アデニンであれば無鉤条虫、シトシンであれば有鉤条虫と同定できる³⁾。

遺伝子検査は、ホルマリン浸漬標本や病理組織切片内に検出される寄生虫の同定にも適用できるので、遺伝子検査の利用価値は高い。条虫類が中心ではあるが、遺伝子検査に関する総説があるので、詳細はそれを参照願いたい⁵⁾。病理組織切片内に見出される寄生虫断端は、虫体の変性や石灰化、あるいは切片作製などによって寄生虫に特徴的な形態がいつも観察できるとは限らないので、そのような場合に遺伝子検査が威力を発揮する。

- 遺伝子増幅を中心とする遺伝子検査は高感度であり，寄生虫の虫卵1個からでもDNAは検出可能である。
- 遺伝子検査は染色標本(HE, PAS, 酢酸カーミン, ギムザなど)から抽出したDNAで検査可能である。

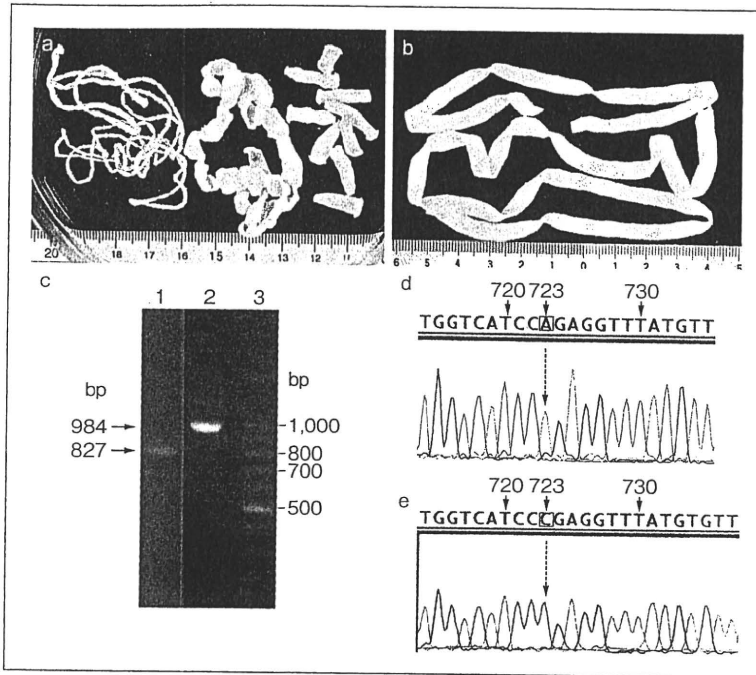


図4 形態的に類似した寄生虫の遺伝子鑑別

駆虫された無鉤条虫(a)と有鉤条虫の成虫(b). c multiplex PCRによって増幅された *coxI* 遺伝子断片. 無鉤条虫は827 bp (lane 1), 有鉤条虫は984 bp (lane 2). また, 塩基配列解析によって *coxI* 遺伝子の723番目の塩基がアデニンであれば無鉤条虫(d), シトシンであれば有鉤条虫(e)と同定できる.

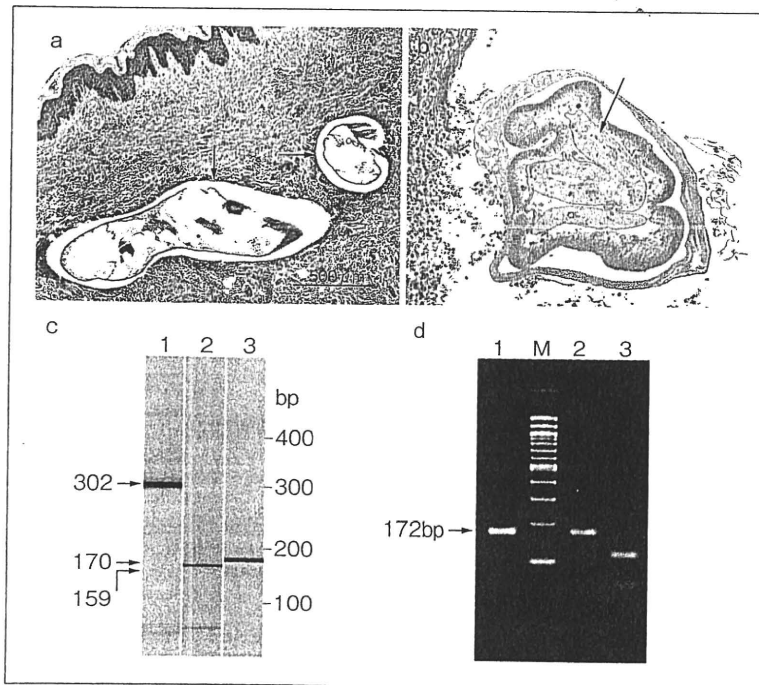


図5 ホルマリン固定された病理組織標本内に検出された寄生虫の分子同定

a 皮下組織内に見出された顎口虫の幼虫(矢印). b 小腸組織内に検出されたアニサキス幼虫(矢印). c aの顎口虫由来DNAを用いてPCR増幅された *coxI* 遺伝子断片 (lanes 1~3). d bのアニサキス由来DNAを用いてPCR増幅されたITS-1の制限酵素 *Hinf I* 切断パターン (lane 1). lane 2と3はそれぞれ比較に用いた *Anisakis simplex* と *Anisakis pegreffii*. (文献6, 7)を改変引用)

● 遺伝子検査は日常検査のみならず、アーカイブ標本を用いた retrospective な研究にも使える。

図5はパラフィン包埋切片内の虫体部から抽出したDNAを用いて感染研で検査を行った例である。ホルマリン固定標本ではDNAが分解され、300bp以下の短いDNA断片しか増幅されることが多いが⁵⁾、増幅されたPCR産物の塩基配列解析から、aの虫体は中南米に分布する二核顎口虫(*Gnathostoma binucleatum*)⁶⁾、bの虫体はアニサキスI型幼虫(*Anisakis simplex*)と同定された例である⁷⁾。ホルマリン固定パラフィン切片標本を用いて遺伝子検査を行う場合には、ホルマリンによるDNA分解を考慮して、増幅産物の大きさが300bp以下になるようにプライマーを設計することが肝要であり、初回のPCRで増幅したDNAを鋳型として2回目のPCRを行うnested PCRが有効な場合が多い。

5. 検査依頼はどのように行うか

臨床家が寄生虫感染の疑いのある患者に遭遇した場合、どのような手順で寄生虫検査を依頼すればいいのか。抗体検出を目的とした血清検査を依頼する場合には、数mlの血清が必要である。また、肺吸虫症では胸水、眼部トキソカラ症では硝子体液や前房水、脳有鉤囊虫症や広東住血線虫症の場合には髄液が用いられることもある。最近、マラリアや一部の寄生虫症で尿を用いた抗体検査が試験的に行われている。遺伝子検査依頼の場合、検体は70～80%エタノール固定、あるいは凍結保存が推奨される。ホルマリン固定標本も遺伝子検査は可能であるが、前述のとおり、ホルマリンはDNAを分解し、遺伝子増幅を困難にするので、ホルマリン固定は病理検査以外では極力避けていただきたい。抗体、遺伝子検査とも検体はクール宅配便で送付可能。検査依頼の方式は検査

研究機関で異なるが、参考までに感染研の例を示す。事前に電話(03-5285-1111, ext. 2200)もしくは電子メールによって連絡を受けると、感染研様式の検査依頼書が依頼者に送付(メール添付)されるので、それに必要事項を記入のうえ、その検査依頼書とともに、検体、病歴経過(各種検査所見、画像所見、病巣部の写真など)を感染研に送付いただいている。検査に要する日数は、血清検査で通常1～2日、遺伝子検査は1週間程度。検査費用は無料。寄生虫検査は感染研(<http://www.nih.go.jp/>)以外でも、大学医学部寄生虫学関連講座(医動物学・熱帯医学・感染症学を含む)や一部の地方自治体衛生研究所、あるいは民間の検査会社などで実施可能である。

文 献

- 1) 山崎 浩ほか：寄生虫症の血清診断法。臨床検査43(13)：1617-1624, 1999
- 2) 田口千香子ほか：眼トキソカラ症におけるToxocaraCHEKの有用性。臨床眼科54(5)：841-845, 2000
- 3) Yamasaki, H. et al. : DNA differential diagnosis of taeniasis/cysticercosis by multiplex PCR. J Clin Microbiol 42(2) : 548-553, 2004
- 4) Nkouawa, A. et al. : Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of Taenia species. J Clin Microbiol 47(1) : 168-174, 2009
- 5) Yamasaki, H. et al. : Significance of molecular diagnosis using histopathological specimens in cestode zoonoses. Trop Med Health 35(4) : 307-321, 2007
- 6) 姜 朱美ほか：皮膚二核顎口虫症。皮膚病診療31(8)：977-980, 2009
- 7) 伊藤元博ほか：PCR法にて同定した消化管外アニサキス症による絞扼性イレウスの1例。日腹救急医誌29(6)：925-929, 2009

Racemose 型有鉤囊虫による脳囊虫症の 1 例

国立感染症研究所 寄生動物部
山崎 浩・杉山 広・森嶋康之・大前比呂思

沖縄県立中部病院 感染症内科
椎木創一

沖縄県立中部病院 脳神経外科
奥山久仁男

沖縄県立中部病院 病理診断科
国島文史

Key Words: racemose 型有鉤囊虫, *Taenia solium* cysticercus, 脳囊虫症

はじめに

脳囊虫症は有鉤条虫 (*Taenia solium*) の幼虫 (= 囊虫) が脳など中枢神経系に寄生することによって引き起される人獣共通寄生虫症であり, 戦前～戦中にかけて沖縄地方では多くのヒト症例が報告された¹⁾。最近の 10 年間では, 全国で年 5 例前後の症例が散発的に報告されているが²⁾, 今回, われわれは沖縄県内で感染したと推定される racemose 型有鉤囊虫による稀な脳囊虫症を経験

したので報告する。

症 例

患 者: 沖縄県うるま市宮城島在住, 53 歳, 日本人男性。

主 訴: 歩行困難, 左半身麻痺の増悪。

既往歴: 小児麻痺, 軽度左半身麻痺, 発語障害。

生活歴: 沖縄県中頭郡与那城町 (現, うるま市, 宮城島) で生まれ, 同所に居住。転居歴や海外渡

A Case of Neurocysticercosis Caused by Racemose-type *Taenia solium* Cysticercus

Hiroshi Yamasaki* Hiromu Sugiyama* Yasuyuki Morishima* Hiroshi Ohmae*
Soichi Shiiki** Kunio Okuyama*** Fumihito Kunishima****

* Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

** Division of Infectious Diseases, Okinawa Prefectural Chubu Hospital

*** Division of Neurosurgery, Okinawa Prefectural Chubu Hospital

**** Division of Pathology, Okinawa Prefectural Chubu Hospital

論文請求先: 山崎 浩 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所 寄生動物部

航歴は無い。10年前に豚の丸焼きを食べた以外に、豚肉を加熱不十分な状態で摂食したことはない。

現病歴：小児麻痺による軽度の左半身麻痺があるものの、歩行には問題はなかった。ところが、2009年6月上旬から左足が前に出にくくなり、6月下旬には独歩できなくなり、さらに左上肢も動かさづらくなったため、同年7月、沖縄県立中部病院脳神経外科を受診した。

入院時頭部画像検査所見：頭部CT、MRI-FLAR検査にて右前頭葉に多胞性嚢胞（図1）と左前頭葉に石灰化病変を認め、脳嚢虫症が疑われた。痙攣はなかったが、左半身麻痺が悪化したために、右前頭葉の嚢胞切除術を施行したところ、右前頭葉クモ膜下腔から葡萄状嚢胞が摘出された。術後は良好で、左半身麻痺は改善している。痙攣も認められない。

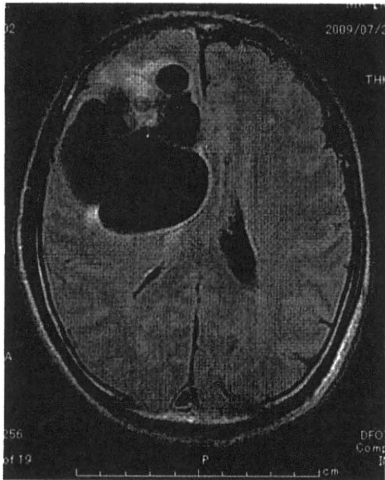


図1 頭部MRI-FLAR所見
右前頭葉クモ膜下の多胞性病巣は一部に高信号域を伴う長径6~7cmの大きさで、内部は均一な低信号病変として認められ、midline shiftや背側の脳溝や脳回を圧迫する所見が見られる。

血清検査：microplate-ELISAを用いた血清検査では、有鉤嚢虫に対する抗体陽性であった。

病理検査所見：摘出された嚢胞の病理検査では、頭節を欠き、嚢胞壁が複雑に入り込み、エオジンに濃染された外層、細胞の多い中間層、網目状の柔組織の3層からなる特徴的な所見が観察され、葡萄状（racemose型）有鉤嚢虫と診断された（図2）。

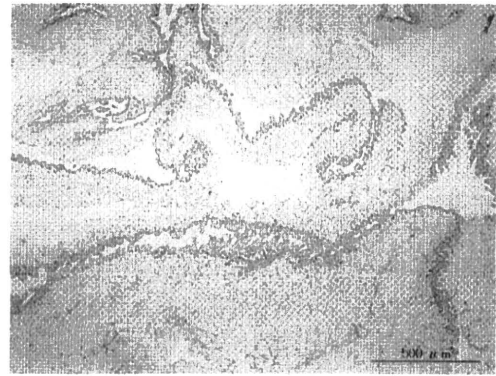


図2 摘出病巣の病理検査所見
嚢胞壁は複雑に入り込み、エオジンで濃染された外層、細胞の多い中間層、粗い網目状の内層（柔組織）の3層からなる。頭節は欠く。HE染色。

DNA検査：有鉤嚢虫の遺伝子型を同定するために、既報に準じて無染色のパラフィン切片を用いてDNA検査を行った³⁾。その結果、ミトコンドリアゲノムでコードされるcytochrome c oxidase subunit 1遺伝子（cox1）の723番目の塩基がシトシン(C)であったことから、アジア型（Asian genotype）であることが確認された（図3）。

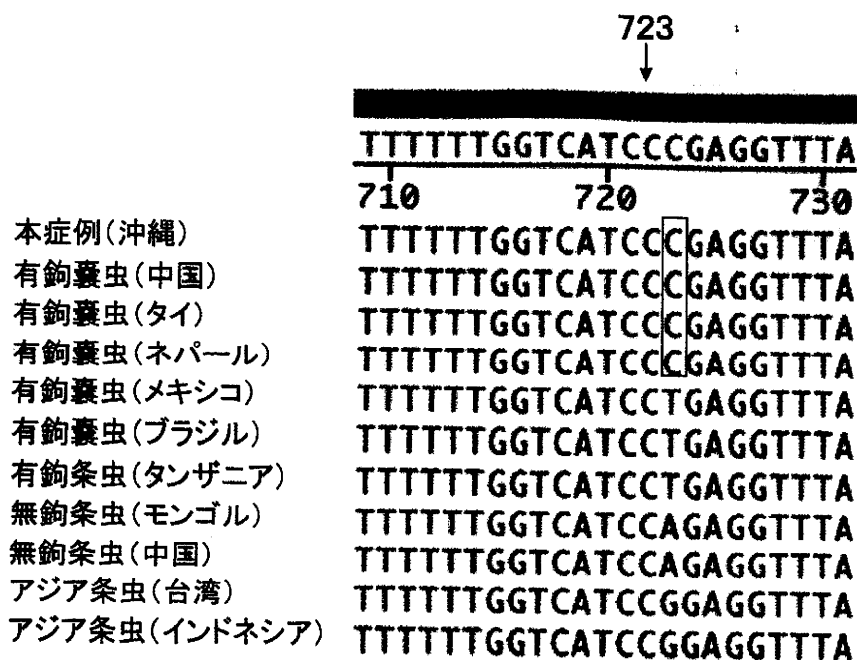


図3 PCR増幅されたcox1遺伝子の塩基配列解析

ヒトに寄生する *Taenia* 属条虫の鑑別マーカーとして723番目の塩基は重要。本症例ではシトシン (C) であったことから、有鉤条虫 (囊虫) のアジア型 (Asian genotype) と同定された。比較に用いた DNA データは以下の通り：有鉤囊虫 (中国 AB066485; タイ AB066487; ネパール AB491986; メキシコ AB066490; ブラジル AB066486; タンザニア AB066493), 無鉤条虫 (モンゴル AB271695; 中国 AB107247), アジア条虫 (台湾 AB107234; インドネシア AB107236)。

考察

わが国における有鉤囊虫症の発生は、かつては沖縄地方で多くの症例が報告され、戦後は同地では激減したが¹⁾、本症例は患者の生活歴、居住歴、また摘出された虫体の状態から比較的最近、沖縄県内で感染したと考えられた。沖縄県内での感染が強く疑われた同様な症例は過去にも、宜野湾市在の日本人男性の脳囊虫症例がある^{4,5)}。

本症例の原因となった囊虫は病理組織所見から、頭節を欠き、葡萄状に発育した racemose 型囊

虫と診断された。国内における racemose 型囊虫による脳囊虫症例はきわめて稀で、前出の宜野湾市の症例^{4,5)}以外に少なくとも4例が報告されているにすぎない⁶⁻⁹⁾。

有鉤囊虫が皮下や筋肉内に寄生した場合には、囊虫は結合織に包まれ、頭節を有する囊胞状 (cellulose 型) 囊虫に発育するが、脳槽や脳室内、あるいはクモ膜下腔に寄生した場合には、多胞性で葡萄状 (racemose 型) 囊虫に発育する、あるいは巨大化することがあり、既報の5症例においても racemose 型囊虫は大槽、脳底槽、あるいはクモ